

УДК 545.256

А.Д. ПАТОВА¹, Е.Н. ПАТОВА¹, Д.М. ШАДРИН¹, Я.И. ПЫЛИНА¹,
И.Н. ЕГОРОВА², С.А. ЯРОВОЙ³

¹Институт биологии Коми НЦ УрО РАН,

ул. Коммунистическая, 28, 167982 Сыктывкар, Коми АР, Россия

e-mail: patova@ib.komisc.ru

²Сибирский ин-т физиологии и биохимии растений СО РАН,

ул. Лермонтова, 132, 664033 Иркутск, Россия

e-mail: egorova@sifibr.irk.ru

³Мелитопольский госпедуниверситет им. Б. Хмельницкого,

ул. Ленина, 20, 72312 Мелитополь, Украина

e-mail: dilabif@ukr.net

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА ПОПУЛЯЦИЙ *NOSTOC COMMUNE* VAUCH.
EX BORN. & FLAH. (CYANOPROKARYOTA) ИЗ РАЗНЫХ РЕГИОНОВ**

Исследовано генетическое разнообразие популяций *Nostoc commune*, произрастающих в горных и равнинных (тундровых, таежных и степных) условиях, на основе фрагмента гена 16S рРНК. Несмотря на высокое генетическое сходство исследованных популяций, выделены клады, объединяющие популяции ностока из различных географических зон.

К л ю ч е в ы е с л о в а : генетическое разнообразие популяций *Nostoc commune*, 16S рРНК.

Введение

На уровне близкородственных таксонов цианобактерии (*Cyanoprokaryota*) имеют очень сходные, трудно различимые морфологические признаки. Особенно это касается представителей рода *Nostoc* Vauch. ex Born. & Flah. Поэтому их точная идентификация в природном материале и в культурах вызывает трудности и требует дальнейшего исследования не только с морфологических и физиологических позиций, но и привлечения современных молекулярно-генетических методов. *Nostoc commune* — широко распространенный в наземных экосистемах вид, способный к кислородному фотосинтезу и фиксации атмосферного азота. Изучение генетической дифференциации популяций *N. commune* — космополитного вида, вызывает интерес, так как ему принадлежит особая роль в структурно-функциональной организации наземных экосистем благодаря способности к фиксации молекулярного азота. Данный вид имеет широкую экологическую амплитуду (способен обитать как в водных, так и наземных условиях, при разных температурах и условиях увлажнения) и используется в качестве модельного объекта многими исследователями. Широкое распространение вида в разных экологических условиях вызывает ряд вопросов, связанных с его идентификацией. Действительно ли в различных экотопах обнаруживается один и тот же вид? Могут ли влиять на генотип вида условия

© А.Д. Патова, Е.Н. Патова, Д.М. Шадрин, Я.И. Пылина,
И.Н. Егорова, С.А. Яровой, 2014

обитания? Исследование генетического полиморфизма географически удаленных популяций *Nostoc*, произрастающих в горных и равнинных местообитаниях различных природно-климатических зон, позволит прояснить вопрос генетической изменчивости внутри вида.

Цель работы – изучение генетического разнообразия популяций *N. commune*, произрастающих в горных и равнинных (тундровых, таежных и степных) условиях с применением фрагмента гена 16S рРНК.

Материалы и методы

Для секвенирования использованы образцы из различных регионов России и Украины (см. таблицу). Тотальную ДНК цианобактерий выделяли с помощью набора «FastDNA Spin Kit» (QBioGene, Canada) согласно инструкциям производителя. Выделенную ДНК хранили при температуре -20 °С. Для амплификации фрагмента последовательности гена 16S использовали праймеры CYA781R (gactactggggtatctaatccatt) и CYA106L (cggacgggtgagtaacgcgtga). Амплификацию проводили в термоциклере Swift MiniPro («ESCO», Сингапур) по схеме: предварительная денатурация – 5 мин при 95 °С; 35 циклов: денатурация – 30 с при 94 °С, отжиг – 30 с при 57 °С, элонгация – 40 с при 72 °С и финальная элонгация – 2 мин при 72 °С. Продукты реакции амплификации разделяли методом электрофореза в 1,3 %-м агарозном геле в *tris*-ацетатном буферном растворе, окрашивали бромистым этидием. Для визуализации использовали трансиллюминатор UVT-1 («Биоком», Москва), в качестве маркера длины фрагментов ДНК – 100 bp Ladder DNA marker (100 bp-3000 bp) («Thermo Scientific», ЕС). Для очистки полученного продукта использовали набор QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Германия). Количество выделенной ДНК и ПЦР-продукта определяли на анализаторе жидкости «Флюорат-02-Панорама» (ООО «Люмэкс», Россия). Секвенирование осуществляли с помощью набора реагентов ABI Prism BigDye Terminator v. 1.1 на приборе ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Выравнивание последовательностей и анализ проводили с использованием программы MEGA 5.0. Для построения филогенетических деревьев применяли метод объединения ближайших соседей (NJ).

Результаты и обсуждение

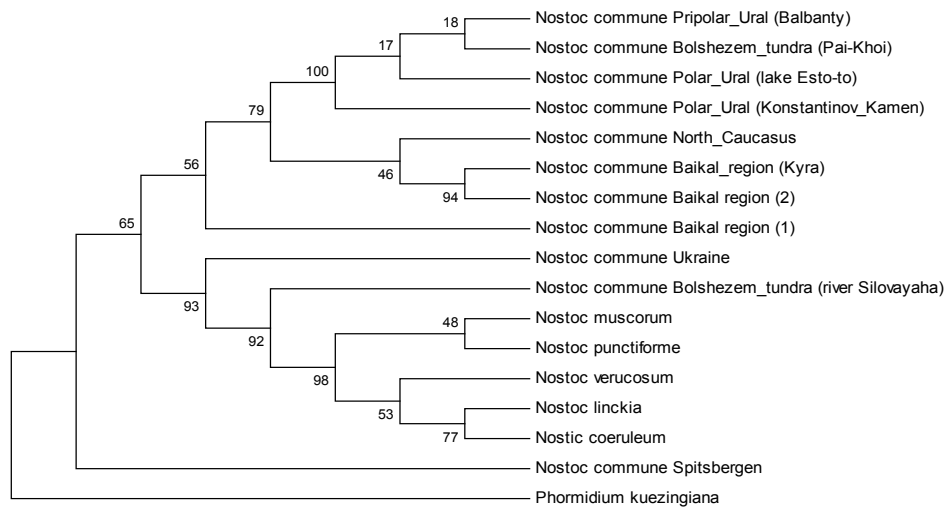
Все исследованные популяции ностока по морфологическим показателям и макроскопическим талломам идентифицированы авторами как *Nostoc commune*. Для выявления генетического разнообразия получены последовательности фрагмента гена 16S рРНК цианобактерий, принадлежащих представителям родов *Nostoc* (шесть видов, включая *N. commune*) длиной 620 п.н. (см. таблицу). Исследованные образцы из разных регионов показали высокое сходство исследуемого генетического материала. Образцы этого вида из разных регионов мира также не показали разнородности генетического материала, который отличался гораздо чаще не по географическому, а по экологическому принципу (Wright et al., 2001; Novis, Smissen, 2006; Reháková et al., 2007; Arima et al., 2012).

На филогенетическом древе (см. рисунок) можно выделить клады, объединяющие носток из разных регионов. В отдельную кладу входят образцы разных популяций *N. commune*, собранные в горно-тундровых районах евро-

пейского севера (Приполярный и Полярный Урал, Пай-Хой). Во второй кладе выделяются (коэффициент бутстрепа – 73) популяции более южных горных и лесостепных регионов (Северный Кавказ, Забайкалье, Иркутская обл.).

Места сбора *Nostoc commune* и номера регистрации секвенсов в GenBank

Место сбора	Официальный номер образца в GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)
Россия, Забайкальский край, окр. с. Кыра	BankIt1643785 Seq1 KF361479
Россия, Респ. Якутия, буферная зона Олекминского заповедника, в долине реки Чуга, кордон Максимовский (1)	BankIt1643802 Seq1 KF361480
Россия, Иркутская обл., юго-западное побережье оз. Байкал, окрестности с. Б. Голоустного (2)	BankIt1643808 Seq1 KF361481
Украина, Днепропетровская обл., Апостоловский р-н, Желтокаменский известняковый карьер	BankIt1643815 Seq1 KF361482
Россия, Респ. Коми, Полярный Урал, Константинов камень	BankIt1643835 Seq1 KF361484
Норвегия, Шпицберген	BankIt1643837 Seq1 KF361485
Россия, Приполярный Урал, у оз. Балбанты	BankIt1643845 Seq1 KF361486
Россия, хребет Пай-Хой	BankIt1643850 Seq1 KF361487
Грузия, окрест. г. Гагры	BankIt1643852 Seq1 KF361488
Россия, Большеземельская тундра, Силоваяха	BankIt1643854 Seq1 KF361489



Молекулярно-филогенетическое древо представителей рода *Nostoc*, построенное методом Neighbor-Joining (NJ) по 16S рРНК (620 п.н.)

Популяции *N. commune*, собранные в Украине и Большеземельской тундре, относительно первых двух групп расположены обособленно и примыкают к кладе с пятью другими видами рода *Nostoc* (*N. linckia*, *N. muscorum*, *N. punctiforme*, *N. coeruleum*, *N. vericosum*), с которыми они связаны парафилетическими отношениями. Генетически наиболее удалена популяция *N. commune*, собранная на архипелаге Шпицберген. Она выделяется на древе в качестве сестринской группы, что связано, скорее всего, с влиянием на неё исторически длительной островной изоляции этой территории.

Заключение

Проведенные исследования указывают на существование незначительного генетического разнообразия в популяциях *Nostoc commune*, обитающих в разных географических зонах. Для выявления популяционной изменчивости необходимы дополнительные исследования с привлечением других генетических маркеров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Arima H., Horiguchi N., Takaichi S. et al. Molecular genetic and chemotaxonomic characterization of the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune* and its neighboring species // FEMS Microbiol. Ecol. – 2012. – 79. – P. 34–45.
- Novis P.M., Smitsen R.D. Two genetic and ecological groups of *Nostoc commune* in Victoria Land, Antarctica, revealed by AFLP analysis // Antarc. Sci. – 2006. – 18(4). – P. 573–581.
- Reháková K., Johansen J.R., Casamatta D.A. et al. Morphological and molecular characterization of selected desert soil cyanobacteria: three species new to science including *Mojavia pulchra* gen. et sp. nov // Phycologia. – 2007. – 46. – P. 481–502.
- Wright D., Prickett T., Helm R.F., Potts M. Form species *Nostoc commune* (Cyanobacteria) // Intern. J. Syst. and Evol. Microbiol. – 2001. – 51. – P. 1839–1852.

Подписал в печать И.Ю. Костиков

A.D. Patova¹, E.N. Patova¹, D.M. Shadrin¹, Ya.I. Pylina¹, I.N. Egorova², S.A. Yarovoy³

¹Institute of Biology, Komi Science Centre, Ural Branch of RAS,
28, Kommunisticheskaya St., 167982 Syktyvkar, Republic of Komi, Russia
e-mail: patova@ib.komisc.ru

²Siberian Institute of Physiology and Biochemistry of Plants, Siberian Branch of RAS,
132, Lermontov St., 664033 Irkutsk, Russia
e-mail: egorova@sifibr.irk.ru

³B. Khmelnytsky Melitopol State Pedagogical University,
20, Lenin St., 72312 Melitopol, Ukraine
e-mail: dilabif@ukr.net

COMPARATIVE MOLECULAR GENETIC CHARACTERIZATION OF THE *NOSTOC COMMUNE* VAUCH. EX BORN. & FLAH. (CYANOPROKARYOTA) POPULATION, COLLECTED IN DIFFERENT REGIONS

On the basis of the 16S rRNA gene fragment studied the genetic diversity of populations of *Nostoc commune*, growing in the mountains and plains (tundra, taiga and steppe) conditions. Despite the high genetic similarity of populations studied, highlighted groups uniting *Nostoc* populations from different geographic areas.

Key words: genetic diversity of populations *Nostoc commune*, 16S pPHK.